

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 20349P WO	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/08193	International filing date (day/month/year) 22 August 2000 (22.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 March 2001 (01.03.01)	Date of completion of this report 26 November 2001 (26.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08193

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-20 _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ 1-43 _____, as originally filed
 pages _____ _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____ _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____ _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08193

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

See supplemental box

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08193**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

Claims 26 - 30 relate to a method for the simultaneous amplification and labelling of cDNA molecules, and Claims 41 - 43 to a method for unravelling double-strand nucleic acids. The subjects of these claims are not so linked with the subjects of the remaining claims as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08193

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	12, 14, 15, 26 - 30, 37, 39 - 43	YES
	Claims	1 - 11, 13, 16 - 25, 31 - 36, 38	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 43	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 43	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents cited in the international search report represent the closest prior art:

- (A) US-A-5 760 130
- (B) US-A-5 622 826
- (C) WO-A-97/18226.

Independent Claims 1 and 31 relate to methods for immobilizing biopolymers on a solid phase. In one case (Claim 1), the surface of the solid phase comprises a reactive group to which a biopolymer, preferably an amino-modified nucleic acid, is covalently bonded. In the other case (Claim 31), the surface of the solid phase comprises an amino group which interacts covalently or non-covalently with the biopolymer.

The subjects of these claims are anticipated in a manner prejudicial to novelty by the disclosures in documents A (see columns 1 and 2 and the claims), B (see the claims and tables) and C (see the claims and Figure 2c). The same applies to Claims 2 - 11, 13, 16 - 25, 32 - 36 and 38, which also fail to comply with the requirements of PCT Article 33(3).

.../...

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08193

(Continuation of V.2)

The subjects of Claims 12, 14, 15, 37, 39 and 40 do not appear to contain an inventive concept *per se* and therefore do not comply with the requirements of PCT Article 33(3).

The subjects of Claims 26 - 30 and 41 - 43, which are not dealt with in any of the international search report citations, are common general knowledge in the relevant technical field and therefore do not comply with the requirements of PCT Article 33(3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08193

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Application No.	Publication date	Filing date	Priority date
Patent No.			(valid claim)
	(day/month/year)	(day/month/year)	(day/month/year)

DE-A-198 15 864 14.10.1999

08.04.1998

Should the claimed priority date not be valid, the above-mentioned document would become relevant for the assessment of novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/18212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :C07H 21/02, 21/04; C12Q 1/68
US CL :435/6; 514/44; 536/24.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6; 514/44; 536/24.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, LIFE SCIENCES, DERWENT, EUROPEAN PATENTS, CA, APS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	US 5,478,893 A (GHOSH ET AL.) 26 December 1995, columns 3-28.	1-19, 22-25, 28
Y, E	US 5,599,667 A (ARNOLD, JR. ET AL.) 04 February 1997, columns 8-12.	1-19, 22-25, 28
Y, P	US 5,514,785 A (VAN NESS ET AL.) 07 May 1996, columns 3-10.	1-19, 22-25, 28
Y	CHEHAB et al. Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. Human Genetics. 01 May 1992, Vol. 89, No. 2, pages 163-168, especially page 164.	20, 21, 26, 27
Y	EP 0,411,186 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 06 February 1991, columns 4-5.	1-19, 22-25, 28

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

•	Special categories of cited documents:		
•A*	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	•T*	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
•E*	earlier document published on or after the international filing date	•X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
•L*	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	•Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
•O*	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	•Z*	document member of the same patent family
•P*	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

05 FEBRUARY 1997

Date of mailing of the international search report

27 FEB 1997

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

PAUL B. TRAN, PH.D.

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)★

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 20349P W0	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 08193	Internationales Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr) 22/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/08/1999
Anmelder		
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

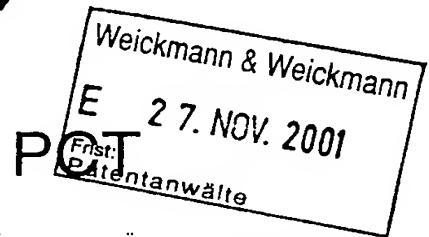
keine der Abb.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESEN**

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE



MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	26.11.2001
----------------------------------	------------

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
20349P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/08/1999
--	---	--

Anmelder
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde ----- Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Neumann, M Tel. +49 89 2399-7351	
--	--	--

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 20349P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts. <input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT). Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten: I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*)

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-43 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- die Ansprüche eingeschränkt.
- zusätzliche Gebühren entrichtet.
- zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- erfüllt ist
- aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- alle Teile.
- die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 12,14,15,26-30,37,39-43
	Nein: Ansprüche 1-11,13,16-25,31-36,38

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche
Nein: Ansprüche 1-43

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-43
Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

Punkt IV

Die Ansprüche 26-30 beziehen sich auf ein Verfahren zur gleichzeitigen Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen, die Ansprüche 41-43 auf ein Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Der Gegenstand dieser Ansprüche ist mit dem Gegenstand der restlichen Ansprüche nicht so verbunden, daß sie eine gemeinsame erforderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT).

Punkt V

Die folgenden im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumente stellen den nächsten Stand der Technik dar:

- (A) US-A-5 760 130
- (B) US-A-5 622 826
- (C) WO-A-97/18 226

Die unabhängigen Ansprüche 1 und 31 beziehen sich auf Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase. In einem Fall (Anspruch 1), enthält die Festphase an ihrer Oberfläche eine reaktive Gruppe, an die ein Biopolymer, bevorzugt eine aminomodifizierte Nukleinsäure, kovalent gebunden wird. Im anderen Fall (Anspruch 31), enthält die Festphase an ihrer Oberfläche eine Aminogruppe, welche kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer ausbildet.

Der Gegenstand dieser Ansprüche wird durch die Offenbarung in den Dokumenten A (siehe Spalten 1,2 und Ansprüche), B (siehe Ansprüche und Tabellen) und C (siehe Ansprüche und Abbildung 2c) neuheitsschädlich vorweggenommen. Dasselbe trifft auf die Ansprüche 2-11,13,16-25,32-36 und 38 zu, die ebenfalls nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT entsprechen.

Der Gegenstand der Ansprüche 12,14,15,37,39 und 40 scheint kein erforderisches Konzept per se zu beinhalten, und entspricht somit nicht den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

Der Gegenstand der Ansprüche 26-30 und 41-43, der in keinem der im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumenten behandelt wird, gehört auf dem betreffenden Fachgebiet zum Allgemeinwissen des Fachmannes und entspricht somit nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT.

Section VI

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
DE-A-19815864	14.10.999	08.04.1998	---

Sollte das beanstandete Prioritätsdatum nicht gültig sein, würde das obige Dokument im Hinblick auf die Beurteilung der Neuheit und der erfinderischen Tätigkeit relevant sein (Artikel 33(2) and (3) PCT).

T
16

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts 20349P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Annehmer EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE et		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: ----- Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten:

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-43 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- die Ansprüche eingeschränkt.
- zusätzliche Gebühren entrichtet.
- zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- erfüllt ist
- aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- alle Teile.
- die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)

Ja: Ansprüche 12,14,15,26-30,37,39-43

Nein: Ansprüche 1-11,13,16-25,31-36,38

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08193

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche
Nein: Ansprüche 1-43

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-43
Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

Punkt IV

Die Ansprüche 26-30 beziehen sich auf ein Verfahren zur gleichzeitigen Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen, die Ansprüche 41-43 auf ein Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Der Gegenstand dieser Ansprüche ist mit dem Gegenstand der restlichen Ansprüche nicht so verbunden, daß sie eine gemeinsame erfinderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT).

Punkt V

Die folgenden im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumente stellen den nächsten Stand der Technik dar:

- (A) US-A-5 760 130
- (B) US-A-5 622 826
- (C) WO-A-97/18 226

Die unabhängigen Ansprüche 1 und 31 beziehen sich auf Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase. In einem Fall (Anspruch 1), enthält die Festphase an ihrer Oberfläche eine reaktive Gruppe, an die ein Biopolymer, bevorzugt eine aminomodifizierte Nukleinsäure, kovalent gebunden wird. Im anderen Fall (Anspruch 31), enthält die Festphase an ihrer Oberfläche eine Aminogruppe, welche kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer ausbildet.

Der Gegenstand dieser Ansprüche wird durch die Offenbarung in den Dokumenten A (siehe Spalten 1,2 und Ansprüche), B (siehe Ansprüche und Tabellen) und C (siehe Ansprüche und Abbildung 2c) neuheitsschädlich vorweggenommen. Dasselbe trifft auf die Ansprüche 2-11,13,16-25,32-36 und 38 zu, die ebenfalls nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT entsprechen.

Der Gegenstand der Ansprüche 12,14,15,37,39 und 40 scheint kein erfinderisches Konzept per se zu beinhalten, und entspricht somit nicht den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.

Der Gegenstand der Ansprüche 26-30 und 41-43, der in keinem der im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumenten behandelt wird, gehört auf dem betreffenden Fachgebiet zum Allgemeinwissen des Fachmannes und entspricht somit nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT.

Section VI

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
DE-A-19815864	14.10.999	08.04.1998	---

Sollte das beanstandete Prioritätsdatum nicht gültig sein, würde das obige Dokument im Hinblick auf die Beurteilung der Neuheit und der erfinderischen Tätigkeit relevant sein (Artikel 33(2) and (3) PCT).

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14585 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68,
C07H 21/00, C12P 19/34, B01J 19/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08193

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. August 2000 (22.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 40 077.6 24. August 1999 (24.08.1999) DE
100 16 073.5 31. März 2000 (31.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; Heidelberger Strasse 49, 69251 Gaiberg (DE). FAULSTICH, Konrad [DE/DE]; Hesselgasse 62, 69168 Wiesloch (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/14585 A1

(54) Title: IMMOBILISING AND MARKING BIOPOLYMERS

(54) Bezeichnung: IMMOBILISIERUNG UND MARKIERUNG VON BIOPOLYMEREN

(57) Abstract: The invention relates to methods for covalent immobilization of biopolymers, especially those of nucleic acids, on a solid phase. Covalent bonds are made between primary or/and secondary amino groups of said biopolymers and groups of the solid phase which react with said amino groups.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biopolymeren, insbesondere von Nukleinsäuren, an eine Festphase. Dabei werden kovalente Bindungen zwischen primären oder/und sekundären Aminogruppen der Biopolymere und mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase geschlossen.

Immobilisierung und Markierung von Biopolymeren

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren, insbesondere von Nukleinsäuren, an eine Festphase. Dabei können kovalente Bindungen zwischen primären oder/und sekundären Amingruppen der Biopolymere und mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase geschlossen werden. Alternativ können die Biopolymere auch durch nichtkovalente Wechselwirkungen an die Festphase gebunden werden.

Die Bindung von Nukleinsäuren an die Oberfläche von Festphasen ist ein sehr kritischer Schritt bei der Herstellung von Biochips. Ein derzeit angewandtes Standardverfahren beinhaltet die Verwendung von mit Polylysin beschichteten Oberflächen, auf denen DNA über Adsorptionswechselwirkungen immobilisiert wird, wobei die Bindeeffizienz durch zusätzliche UV-Quervernetzung erhöht wird. Dieses Verfahren hat jedoch erhebliche Nachteile hinsichtlich der Wiederverwendbarkeit der Chips, der Bindekapazität, der Beschränkung auf lange DNA-Fragmente, der Beschädigung von DNA, z.B. durch Abspaltung von Purinbasen unter Bildung von Photodimeren, der Ablösung von Verbindungen und des Signalhintergrunds aufgrund unspezifischer Bindungen an die Oberfläche während der Hybridisierung.

25

Es besteht daher ein Bedürfnis, eine wirksame und einfache Methode zur Bindung von Biopolymeren, insbesondere DNA und Oligonukleotiden beliebiger Länge, an Festphasen bereitzustellen, um die oben genannten Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise zu überwinden.

30

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein neues Verfahren zur Herstellung von Biochips, insbesondere Nukleinsäurechips bereitgestellt, das auf einer

- 2 -

Bindung von Biopolymeren an eine Festphase beruht. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens werden Nukleinsäuren immobilisiert, die an ihrem 5'-Ende eine Aminogruppe tragen und die durch enzymatischen Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleosidbausteinen in Nukleinsäuren und

5 anschließende ortsspezifische Spaltung der Nukleinsäuren erhältlich sind.

Dieses Verfahren ist detailliert in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP99/02320 beschrieben, auf die in diesem Zusammenhang ausdrücklich verwiesen wird.

10 Ein erster Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen 15 Festphasen, die auf mindestens einem Teil ihrer Oberfläche Gruppen, die mit Aminogruppen eine Reaktion eingehen können, ausgewählt aus Halogenid-, Aldehyd-, Epoxid-, Isocyanat- und Isothiocyanatgruppen, enthält,

(b) Bereitstellen eines Biopolymers mit einer reaktiven Aminogruppe und

20 (c) kovalentes Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die reaktive Aminogruppe des Biopolymers, bei der es sich vorzugsweise um eine primäre oder/und sekundäre Aminogruppe handelt, mit einer reaktiven Gruppe der Festphase eine kovalente Bindung ausbildet.

25

Die mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase werden ausgewählt aus Halogenidgruppen, insbesondere Alkyl- oder/und Arylhalogenidgruppen, Aldehydgruppen, Epoxidgruppen, Isocyanatgruppen und Isothiocyanatgruppen, wobei Arylhalogenid-, Aldehyd- und Isocyanatgruppen bevorzugt sind. Diese reaktiven Gruppen werden durch Modifizierung der Festphase 30 erzeugt. Die Festphase wird wiederum vorzugsweise ausgewählt aus

- 3 -

Materialien auf Siliciumbasis, beispielsweise Silicium, Siliciumdioxid, Silicatgläsern oder Silicium/Siliciumdioxid.

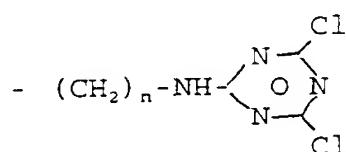
Die in Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellte 5 aktivierte Festphase umfaßt vorzugsweise eine Struktur der allgemeinen Formel (I):

Z - R (I)

10 worin Z Silicium, Siliciumdioxid, ein Silicatglas oder eine oxidierte Siliciumschicht bedeutet,

R - $(\text{CH}_2)_n\text{-Cl}$

15 - $(\text{CH}_2)_n\text{-N=CH-}(\text{CH}_2)_m\text{-C=O}$



25 - $(\text{CH}_2)_n\text{-CH(O)-CH}_2$

30 - $(\text{CH}_2)_n\text{-NH-C(=O)-NH-R'-N=C=S(O)}$

35 - $(\text{CH}_2)_n\text{-NH-CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_m\text{-C=O}$ oder

- $(\text{CH}_2)_n\text{-N=C=S(O)}$

bedeutet,

R' einen Alkylen- oder Arylenrest, insbesondere einen 1,4-Phenylenrest

40 bedeutet, und

n und m jeweils eine positive ganze Zahl vorzugsweise von 1 bis 20 bedeuten.

- 4 -

Die zu immobilisierenden Biopolymere werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleinsäuren, beispielsweise DNA-Molekülen, RNA-Molekülen oder/und Oligonukleotiden, und Nukleinsäureanaloga wie beispielsweise peptidischen Nukleinsäuren (PNA).

5

Besonders bevorzugt werden aminomodifizierte Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga mit einer Struktur der allgemeinen Formel (II) an die Festphase immobilisiert:

10



worin

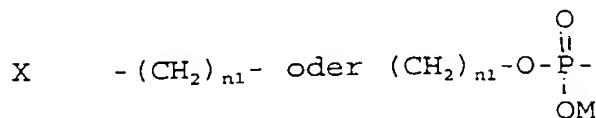
R¹ Wasserstoff oder eine C₁-C₆-Alkylgruppe bedeutet,

NS eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA oder ein Oligonukleotid, oder ein Nukleinsäureanalogon bedeutet,

15 X eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe bedeutet und X mit dem 5'- oder/und 3'-terminalen Baustein von NS verknüpft ist.

15

Besonders bevorzugt bedeutet NS eine Nukleinsäure und die Gruppe R¹NH-X ist über das 5'-C-Atom des 5'-terminalen Zuckerrest, bei dem es sich insbesondere um einen Deoxyriboserest handelt, mit NS verknüpft. X wiederum bedeutet vorzugsweise



25

worin

n1 eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20, z.B. 3,6 oder 12 bedeutet und

M Wasserstoff oder ein Kation bedeutet.

30

Die 5'-aminomodifizierten Nukleinsäuren können - wie in PCT/EP99/02320 beschrieben - durch enzymatischen Einbau von 5'-aminomodifizierten

- 5 -

Nukleotidbausteinen in Nukleinsäuren und anschließende ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe erzeugt werden. Der enzymatische Einbau kann unter Verwendung von Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasen und Terminalen Transferasen erfolgen. Besonders bevorzugt ist die T7 DNA-Polymerase oder verwandte Enzyme wie die T3 oder die SP6 DNA-Polymerase oder Modifikationen dieser Enzyme.

10 Die ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe kann durch Temperaturerhöhung, z.B. auf mindestens 37°C, Einstellung saurer Bedingungen, z.B. $\text{pH} \leq 5$, Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung, z.B. mit einem Infrarotlaser oder/und 3'-seitig des die 5'-Aminogruppe enthaltenden Nukleotids durch enzymatischen Verdau, beispielsweise mit
15 Exo- oder Endonukleasen oder Phosphodiesterasen, z.B. $3' \rightarrow 5'$ -Schlangengiftphosphodiesterase erfolgen.

Ebenso denkbar ist jedoch auch eine Verknüpfung von X mit dem 3'-terminalen Baustein von NS.

20 Die Immobilisierung der aminofunktionalen Biopolymere auf der Festphase erfolgt vorzugsweise unter alkalischen Bedingungen, z.B. bei einem pH-Wert von 9 bis 11. Die Biopolymere werden in einer Lösung, günstigerweise in Konzentrationen von 0,1 bis 100 μM , insbesondere 2 bis 50 μM mit der zu beschichtenden Festphase in Kontakt gebracht. Eine zu beschichtende Fläche hat eine Größe von vorzugsweise 0,1 bis 100 mm^2 , wobei in vielen Fällen mehrere Flächen auf einer Festphase mit gleichen oder unterschiedlichen Biopolymeren beschichtet werden. Nach dem
25 Beschichten, z.B. durch Aufspotten, wird die Festphase getrocknet und anschließend in einem wässrigen Medium bei erhöhter Temperatur, z.B. $\geq 40^\circ\text{C}$ inkubiert. Auf diese Weise können beschichtete Festphasen erhalten

- 6 -

werden, die eine Bindekapazität von bis zu einigen 100 fmol des Biopolymers, z.B. eines Oligonukleotids, pro mm² besitzen.

Bei der Festphase kann es sich um einen Biochip handeln, der 5 gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren belegte definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthält. Vorzugsweise weist die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (III) auf:



10

worin Z die Festphase bedeutet,

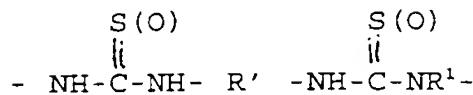
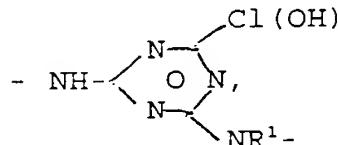
R² - (CH₂)_{n2}- bedeutet,

Y - N=CH- (CH₂)_m-CH=N-,

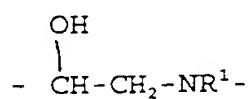
- NH-CH₂- (CH₂)_m-CH₂-NR¹⁻,

- NR¹⁻,

15



oder



35 bedeutet, R', R¹, NS und X wie zuvor definiert sind,

n2 eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20, z.B. 1, 3, 6 oder 12 bedeutet, und

m wie zuvor definiert ist.

40

- 7 -

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur der allgemeinen Formel (III) und die Verwendung der Festphase zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren, die vorzugsweise aus biologischen Proben stammen und beispielsweise aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Peptiden, Polypeptiden, Lipiden und Kohlenhydraten ausgewählt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als freie Biopolymere Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäureanaloga verwendet, die 5'-aminomodifizierte Nukleotidbausteine wie in PCT/EP99/02320 beschrieben enthalten. Aufgrund der Labilität der P-N-Bindung in diesen Nukleinsäuren gegenüber Temperaturerhöhung, sauren Bedingungen, Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung oder/und enzymatischem Verdau kann nach Beendigung der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Biopolymeren und den modifizierten freien Biopolymeren ein selektiver Abbau der freien Biopolymere erfolgen. Dies ist insbesondere bei Verwendung von längeren Nukleinsäurefragmenten als immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren von Bedeutung, bei denen die Länge doppelsträngiger Hybridisierungsbereiche größer als 100 Basen und besonders bevorzugt größer als 200 Basen, z.B. 500 bis 2000 Basen, sein kann. Bei derartig langen Hybridisierungsbereichen ist die Ablösung von freien Biopolymeren nach Beendigung der Untersuchung üblicherweise nur unter relativ drastischen Bedingungen möglich, wodurch eine Wiederverwendung der immobilisierten Biopolymere für eine Rehybridisierung erschwert wird. Diese Schwierigkeiten können bei Verwendung von Nukleinsäuren mit 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteinen als Biopolymere beseitigt werden. In diesem Fall muß als immobilisiertes Biopolymer eine nicht-modifizierte Nukleinsäure eingesetzt werden.

- 8 -

Ein zweiter Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur kovalenten oder nichtkovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen Festphasen, die mindestens auf einem Teil ihrer Oberfläche Aminogruppen enthält,

(b) Bereitstellen eines Biopolymers und

(c) Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die Aminogruppen enthaltende Festphase stabile kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer, insbesondere einer Nukleinsäure, beispielsweise einer unmodifizierten Nukleinsäure oder einer aminomodifizierten Nukleinsäure (wie zuvor beschrieben) ausbildet.

15

Die Aminogruppen der Festphase werden vorzugsweise durch Behandlung der Festphasenoberfläche mit einer Aminosilylverbindung erzeugt. Diese Aminosilylverbindung weist vorzugsweise eine Struktur der allgemeinen Formel IV auf:

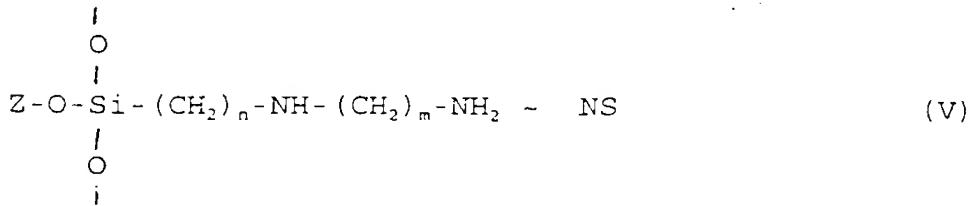
20



wobei R^1 Wasserstoff oder eine C₁-C₃-Alkylgruppe, vorzugsweise einen Methylrest, bedeutet und n und m wie zuvor definiert sind. Besonders bevorzugt ist die Verbindung der Formel (IV) N-(6-Aminohexyl)-aminopropyltrimethoxysilan.

30 Durch Bindung von Biopolymeren wird eine Festphase erhalten, beispielsweise ein Biochip, der gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren belegte definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthält. Vorzugsweise weist die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (V) auf:

- 9 -



wobei NS, Z, n und m wie vorstehend definiert sind und \sim eine kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung darstellt.

10

Die zu immobilisierenden Biopolymere werden vorzugsweise mittels Mikroinjektionspipetten auf der Festphase aufgebracht. Diese Mikroinjektionspipetten sind beispielsweise Glaskapillaren, die an ihrer Öffnung einen Durchmesser von $0,1 \mu\text{m}$ bis 1 mm , vorzugsweise $0,5 \mu\text{m}$ bis 15 $100 \mu\text{m}$ aufweisen. Mittels dieser Mikroinjektionspipetten können extrem kleine Flächenbereiche mit immobilisierten Biopolymeren auf der Oberfläche erzeugt werden, was zu einer erheblichen Vergrößerung der Array-Dichte auf der Festphase führt. Der Durchmesser einzelner Flächenbereiche auf der Festphase beträgt vorzugsweise $0,5$ bis $10 \mu\text{m}$, beispielsweise etwa $3 \mu\text{m}$, 20 während im Stand der Technik üblicherweise nur Durchmesser von etwa $100 \mu\text{m}$ erreicht werden. Die Verbesserung der Array-Dichte, die durch Verwendung von Mikroinjektionspipetten erreicht wird, ist insbesondere für Festphasen mit Strukturen der allgemeinen Formeln (III) und (V) von 25 Bedeutung. Es werden jedoch auch bei Array-Strukturen, die auf andere Weise hergestellt wurden, Verbesserungen erzielt.

Vorzugsweise werden auf Hybridisierung basierende Wechselwirkungen der immobilisierten Biopolymere mit freien Biopolymeren untersucht. Um eine optimale Hybridisierung zu erreichen, erfolgt nach dem Inkontaktbringen der 30 beschichteten Festphase mit den freien Biopolymeren zunächst eine Denaturierung bei erhöhter Temperatur und dann eine Inkubation bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur für eine ausreichende Zeitdauer und unter Verwendung eines geeigneten Hybridisierungspuffers. Bevorzugte Bedingungen für die Hybridisierung insbesondere von cDNA-Molekülen an 35 immobilisierte Oligonukleotide sind eine Hybridisierungstemperatur von 2 bis

- 10 -

10°C, eine Hybridisierungsdauer von mindestens 4 h und ein Hybridisierungspuffer, der 1 bis 50 mM divalente Metallionen, insbesondere Magnesiumionen bei einem pH-Wert von 7 bis 9 enthält. Die Konzentration der freien Biopolymere, z.B. cDNA-Moleküle beträgt vorzugsweise 0,1 bis 10 5 μ M. Nach der Hybridisierung wird bei einer für die jeweils gewünschte Stringenz ausreichenden Temperatur (siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) gewaschen.

10 Die Festphase kann beispielsweise zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, für Untersuchungen der Expression von Genen, der Funktion von Genen und des Metabolismus eingesetzt werden. Weitere Anwendungen der Festphase sind das Auffinden neuer Wirkstoffe und Medikamente bzw. deren Wirkung und gegebenenfalls Nebenwirkungen, der Nachweis 15 gentechnisch veränderter Lebensmittel und die Detektion von Mutationen.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen von auf einer Hybridisierung basierenden Wechselwirkungen von immobilisierten und freien Biopolymeren, umfassend 20 eine erfindungsgemäße Festphase, mindestens eine markierte Hybridisierungssonde, einen geeigneten Hybridisierungspuffer und eine Hybridisierungskammer gegebenenfalls verbunden mit einer Pumpvorrichtung und einer Temperaturkontrollvorrichtung. Die Vorrichtung kann zum Nachweis der Bindung von markierten Hybridisierungssonden an immobilisierte 25 Biopolymere verwendet werden. Gebundene Hybridisierungssonden können von der Festphase ohne Verlust immobilisierter Biopolymere abgelöst werden, wodurch der Einsatz der Vorrichtung für einen oder mehrere weitere Hybridisierungszyklen ermöglicht wird.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform wird als Hybridisierungssonde ein Gemisch mehrerer unterschiedlicher cDNA-Moleküle verwendet. Dieses cDNA-Molekülgemisch ist erhältlich durch ein Verfahren das die gleichzeitige

- 11 -

Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen beinhaltet und die Schritte umfaßt:

- (a) Bereitstellen von RNA-Molekülen, vorzugsweise eine Population unterschiedlicher RNA-Moleküle, z.B. Gesamt-RNA, mRNA oder andere RNA-Fraktionen aus einer biologischen Probe,
- (b) Reverses Transkribieren der RNA-Moleküle unter Verwendung geeigneter Primer ohne Einführung von Markierungsgruppen in die resultierenden cDNA Moleküle,
- (c) gleichzeitiges Markieren und Amplifizieren der cDNA Moleküle unter Verwendung eines oder mehrerer markierter Deoxyribonukleosid-triphosphate und
- (d) gegebenenfalls Aufreinigen der resultierenden cDNA Moleküle.

Die Reverse Transkription wird vorzugsweise durch Poly-dT-Priming durchgeführt, wobei ein Poly-dT-Primer, der zusätzlich einen Abschnitt einer kodierenden Region enthält, unter Bedingungen verwendet wird, bei denen zusätzliche Nukleoside an das 3'-Ende der revers transkribierten cDNA angefügt werden (z.B. die Superscript II Reverse Transkriptase von GIBCO/Life Technologies, die 3 C-Reste anfügen kann) und eines entsprechenden komplementären Oligonukleotids (z.B. eines SMART-Oligonukleotids mit einer 5'-GGG-Region von Clontech). Die Amplifikation erfolgt vorzugsweise mittels PCR, wobei ein zur kodierenden Region komplementärer Primer und eine Nukleosidtriphosphatmischung, die ein oder mehrere markierte Triphosphate enthält, verwendet wird. Die Markierung kann eine radioaktive Markierungsgruppe sein. Bevorzugt sind jedoch Fluoreszenzgruppen wie etwa Fluorescein, CY5 und CY3.

Die Einführung der Markierungsgruppen während des Amplifikationsschritts hat den Vorteil, daß größere Mengen markierter Sonden erhalten werden. Weitere Vorteile dieser Prozedur sind eine höhere Signaldynamik während der Messung und die Möglichkeit, unterschiedliche Markierungsgruppen zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zusätzlich während des Amplifikationsschrittes 5'-aminomodifizierte Nukleotide wie in PCT/EP99/02320 beschrieben als Bausteine für die enzymatische Synthese der Amplifikationsprodukte verwendet. Die auf diese Weise hergestellten Amplifikationsprodukte enthalten labile P-N-Bindungen, die unter definierten Bedingungen (siehe oben) gespalten werden können. So wird nach Beendigung des Hybridisierungsexperiments das Ablösen markierter Hybridisierungssonden von der Festphase erleichtert, wodurch eine weitere Erhöhung der Anzahl von möglichen Rehybridisierungszyklen für die Festphase erreicht wird.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren aufgrund ihrer Basensequenz, wobei einer der die doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente bildenden Nukleinsäurestränge mindestens einen 5'-aminomodifizierten Nukleotidbaustein enthält.

Die Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren aufgrund ihrer Basensequenz erlaubt die Unterscheidung von im wesentlichen gleich langen Nukleinsäurefragmenten, die sich nur durch ihre Basensequenz unterscheiden. Bei einer derartigen Auftrennung erfolgt ein zumindest partielles Aufschmelzen der Nukleinsäuredoppelstränge beispielsweise durch einen Temperaturgradienten oder einen Gradienten von Denaturierungsmittel. Das Ausmaß dieses Aufschmelzens wird bei gegebenen Bedingungen durch die Stärke der Basenpaarung zwischen den beiden Nukleinsäuren bestimmt und ist somit von der spezifischen Nukleinsäuresequenz abhängig. Derartige Verfahren werden beispielsweise zur Mutationsanalyse, z.B. zur Analyse von Punktmutationen, verwendet. Bei Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleotidbaustenen in einen der beiden Nukleinsäurestränge, z.B. durch Verwendung entsprechender Primer, kann - bei entsprechender Temperaturerhöhung - eine ortsspezifische Spaltung des modifizierten Nukleinsäurestranges an einer jeweils gewünschten Position erfolgen. Vorzugsweise

- 13 -

werden die 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteine an derjenigen Position bzw. denjenigen Positionen eingebaut, wo eine Mutation vermutet wird. Eine während der Auftrennung durch eine entsprechende Matrix, z.B. ein Gelmedium oder eine flüssigkeitschromatographische Trennmatrix, bei 5 Einstellung entsprechender Temperaturbedingungen erfolgende Spaltung der P-N-Bindung am 5'-aminomodifizierten Nukleotidbaustein führt zu einer signifikanten Verbesserung des Auftrennungsverhaltens und somit zu einer besseren Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Nukleinsäurefragmente 10n gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz.

Der ortsspezifische Einbau von 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteinen erfolgt vorzugsweise durch Auswahl von Kombinationen geeigneter Primer und 5'-aminomodifizierten Nukleosidtriphosphaten und Erzeugen eines modifizierten Komplementärstrangs durch Primerextension.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert werden.

Beispiele

1. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von aromatischen trisubstituierten Aminen

1.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

Standard-Objektträger (Menzel) wurden mit konzentrierter Chromschwefelsäure bei Raumtemperatur für 1 h gereinigt und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur in 65 %ige Salpetersäure gegeben und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur in halbkonzentrierte Salzsäure gegeben und danach wieder mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

- 14 -

Nach Trocknung wurden die Objektträger mit 1 % Trimethoxy-3-amino-propylsilan in wasserfreiem Toluol oder Dichlormethan oder in Methanol:Wasser (1:1) für 3 h bei Raumtemperatur behandelt und danach 3 h bei 110°C getrocknet.

5

Derivatisierte Objektträger des Typs CSA 100 (CEL Associates, Texas, USA) können für die meisten Anwendungen ebenfalls eingesetzt werden.

1.2 Aktivierung der Oberflächen

10

2 g Cyanurchlorid wurden in 20 ml trockenem Aceton gelöst und zu 180 ml trockenem N,N-Dimethylformamid (DMF) gegeben. Anschließend wurden 500 µl N,N-Diisopropylethylamin zugesetzt. Die gemäß 1.1 hergestellten Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 30 min in diese Lösung gegeben und anschließend 2 min mit DMF und 2 min mit Aceton gewaschen. Nach Trocknung sollten die Objektträger sofort verwendet werden.

15

2. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von Dialdehyden

20

2.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

25

Standard-Objektträger (Menzel) wurden wie unter 1.1 beschrieben mit Chromschwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure gereinigt und anschließend getrocknet.

2.2. Aktivierung der Oberflächen

30

Die Objektträger wurden in eine 25%ige Lösung von Glutardialdehyd in bidestilliertem Wasser gegeben und dort für 24 h stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen und mit bidestilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

- 15 -

3. Herstellung einer aktivierten Festphase unter Verwendung von Isocyanaten

3.1 Derivatisierung von Glasoberflächen

5 Standard-Objektträger (Menzel) wurden wie unter 1.1 beschrieben mit Chromschwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure gereinigt und anschließend getrocknet.

3.2 Aktivierung der Oberflächen

10

Die Objektträger wurden mit 1% 3-Isocyanato-propyl-dimethylchlorsilan in wasserfreiem Toluol für 3 h bei Raumtemperatur in Kontakt gebracht und anschließend getrocknet.

15 4. Kovalente Bindung von DNA an aktivierte Glasoberflächen

5'-(C₆)-aminomodifizierte oder 5'-(C₁₂)-aminomodifizierte Oligonukleotide wurden manuell unter Verwendung einer Standardpipette auf die aktivierte Oberflächen aufgespottet. Zum Aufspotten wurden 0,1 M Natriumcarbonat 20 pH 10 mit einer Oligonukleotid-Konzentration zwischen 2 bis 50 µM verwendet. Es wurden Volumina von etwa 0,05 µl auf eine Oberfläche von etwa 1 mm² aufgebracht.

25 Die aufgespotteten Oligonukleotide wurden getrocknet und dann in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Hybridisierungskammer gegeben und dort bei 50°C für etwa 1 bis 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in Wasser oder Pufferlösung gewaschen und getrocknet.

5. Charakterisierung der Bindung von immobilisierten Nukleinsäuren an die Festphase

Die Stabilität der kovalenten Bindung von 5'-(C₆)-aminomodifizierten oder 5'-C₁₂)-aminomodifizierten Oligonukleotiden an die Festphase wurde getestet. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die am 3'-Ende mit Fluorescein oder CY5 markiert waren. Die an die aktivierte Oberfläche gebundenen Oligonukleotide wurden in Wasser oder Hybridisierungspuffer bei erhöhten Temperaturen für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert.

10

Die Stabilität der kovalenten Immobilisierung wurde über das Integral des Fluoreszenzsignals bestimmt. Die Menge gebundener Oligonukleotide wurde durch Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt, die durch Fluoreszenz-scanning bekannten Mengen an Molekülen aufgezeichnet wurde.

15

Die Ergebnisse für die Stabilität der kovalenten Bindung sind in der folgenden Tabelle gezeigt:

Zeit	0	30	90	150	210
T = 90 °C	90,7	96,0	88,4	102,4	102,4
T = 85 °C	87,1	101,8	91,8	95,3	92,4
T = 80 °C	99,9	103,8	97,8	103,5	102,5

20 Es ist ersichtlich, daß selbst nach längerer Inkubation bei erhöhter Temperatur keine signifikante Ablösung der immobilisierte Oligonukleotide erfolgt.

25 Die Bindekapazität der Festphase beträgt bis zu einigen 100 fmol Oligonukleotid/mm².

- 17 -

6. Herstellung modifizierter PCR-Produkte

Eine PCR wurde unter Verwendung 5'-(C₆)-aminomodifizierter oder 5'-(C₁₂)-aminomodifizierter Primer durchgeführt. Die Herstellung dieser Primer 5 erfolgte durch chemische Synthese nach "Standard-Amidit-Chemie" aus kommerziell erhältlichen Synthesebausteinen. Als Primer wurden sowohl Standardprimer als auch genspezifische Primer verwendet. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die resultierenden modifizierten 10 PCR-Produkte wurden wie unter Punkt 4 beschrieben an einer Festphase immobilisiert.

7. Simultane Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung von cDNA-Pools mit unbekannten Sequenzen

15 Anstelle der Einführung von Fluoreszenzmarkierungen während der Reversen Transkription wurde die RNA zunächst in cDNA revers transkribiert und anschließend in einem zweiten Schritt simultan markiert und amplifiziert.

20 Die Reverse Transkription (RT) wurde gemäß der im SMART PCR cDNA-Synthesekit (Clontech, Produktbroschüre Seite 19) durchgeführt.

Eine typische Prozedur ist nachfolgend angegeben.

Komponenten des Reaktionsansatzes:

25 - 4 µl cDNA (aus RT)
- 33 µl Wasser
- 5 µl 10 x cDNA PCR-Puffer (Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)
- 6 µl Nukleotidmix
30 - für die Markierung mit Fluorescein ist der PCR Fluorescein Labelling Mix von Boehringer Mannheim geeignet;
- für CY5 oder CY3 wird folgendes Protokoll verwendet:

Verbindung	5 x konz. [nM]	Konzentration der Stammlösung [nM]	zuzugebendes Volumen [µl]
CY5-dUTP oder CY3-dUTP	0,5	1	25
dTTP	1	100	0,5
dATP	2,5	100	1,25
dCTP	2,5	100	1,25
dGTP	2,5	100	1,25
Wasser	/	/	20,75
Σ			50

10

- 1 µl PCR-Primer (10 µM, Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)
- 1 µl 50 x Advantage cDNA-Polymerasemix (Clontech, SMART PCR cDNA Synthesekit)

15

Das Reaktionsvolumen beträgt insgesamt 50 µl. Die Reaktion wird in folgenden Zyklen durchgeführt: 95°C 1 min; 24 Zyklen: 95°C 15 s, 65°C 30 s und 68°C 8 min.

20

Die gereinigte markierte Sonde (PCR-Produkt gemäß Beispiel 7, zweimal über Microcon Membranen, vorzugsweise Microcon 100 Membranen gereinigt) wurde in 1 x Annealing Puffer (1 M Tris HCl pH 8,0; 100 mM MgCl₂ oder 5 x SSC) in der jeweils gewünschten Konzentration (vorzugsweise so hoch wie möglich, z.B. 25 mM) gelöst. 10 bis 25 µl der Lösung wurden auf die in Beispiel 4 hergestellten Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Objektträger versiegelt, beispielsweise durch Abdecken mit einem weiteren ggf. hydrophobisierten (z.B. mit Trimethylchlorsilan) Objektträger. Nach 1 h erfolgte eine Denaturierung bei 80°C für mindestens 3 min und dann eine Inkubation bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur für 4 bis 36 h. Bevorzugte Bedingungen für die Hybridisierung mit

- 19 -

Oligonukleotiden waren 4 °C für 8 bis 12 h unter Verwendung von Lösungen mit einer Konzentration von 2 μ M Oligonukleotid in 100 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂. Dann wurde in 0,1 x SSC bei einer für die jeweils gewünschte Stringenz ausreichenden Temperatur gewaschen.

5

Der Nachweis der Fluoreszenzsignale erfolgte unter Verwendung eines Fuji FLA2000 Fluoscaner oder eines Fluoreszenzmikroskops und einer CCD Kamera.

10 Bei Verwendung zweier unterschiedlicher kovalent gebundener Primer (18-
mere) mit verschiedenen Sequenzen, die mit einer Lösung eines fluores-
zenzmarkierten Oligonukleotids, das zu einem der gebundenen Moleküle
vollständig und zu dem anderen teilweise (30%) komplementär war, konnte
eine spezifische Hybridierung ausschließlich mit dem vollständig
15 komplementären Primer gezeigt werden.

Um die Wiederverwendbarkeit der beschichteten Festphasen zu testen,
wurden die hybridisierten DNA-Moleküle (Oligonukleotide) durch Waschen
bei 90 °C für 20 - 60 min unter leichtem Schütteln dehybridisiert. Die
20 Dehybridisierung wurde durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Nach
vollständiger Dehybridisierung zeigten die Chips kein Fluoreszenzsignal mehr
und konnten für eine zweite Hybridisierungsrounde verwendet werden. Eine
Wiederverwendung war mehrere Male (mindestens fünfmal) ohne signifikan-
ten Verlust gebundener DNA-Moleküle möglich.

25

Beispiel 9 Nichtkovalente Immobilisierung

Die Bindung von DNA an die Festphase muß nicht definiert kovalent sein,
sondern kann auch mit N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan erfol-
30 gen. Dazu wurden die zu modifizierenden Gläser einer 0,01-3%igen Lösung
von N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan in Methanol:Wasser (=
1:1) ausgesetzt und ca. 1-3 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln

- 20 -

reagieren gelassen. Danach wurden die Gläser ausgiebig mit Methanol, Wasser und wieder Methanol gewaschen. Überschüssiges Methanol wurde durch Zentrifugation bei 500 U/min entfernt und die Gläser bei 130°C ca. 3 h in einem Ofen reagieren gelassen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die aufzubringende DNA (mit oder ohne 5'-Aminomodifikation) in Wasser oder Puffer gelöst aufgetropft. Die Anbindung der DNA an das modifizierte Glas erfolgte durch einstündiges Einwirken in gesättigter Wasseratmosphäre bei ca. 40 bis 50°C und anschließendes Backen bei 110°C für 10 bis 15 Minuten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur waren die so gefertigen DNA-Arrays für die weitere Vorgehensweise (Denaturierung, Hybridisierung, Waschen und Detektion) einsatzbereit.

Patentansprüche

1. Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen Festphasen, die auf mindestens einem Teil ihrer Oberfläche mit Aminogruppen reaktive Gruppen ausgewählt aus Halogenid-, Aldehyd-, Epoxid-, Isocyanat- und Isothiocyanatgruppen enthält,
 - (b) Bereitstellen eines Biopolymers mit einer reaktiven Aminogruppe und
 - (c) kovalentes Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die mit Aminogruppen reaktiven Gruppen der Festphase ausgewählt werden aus Arylhalogenid-, Aldehyd- und Isocyanatgruppen.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase ausgewählt wird aus Silicium, Siliciumdioxid,
Silicatgläsern und Silicium/Siliciumdioxid.
- 25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase eine Struktur der allgemeinen Formel (I) umfaßt:

30

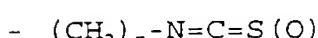
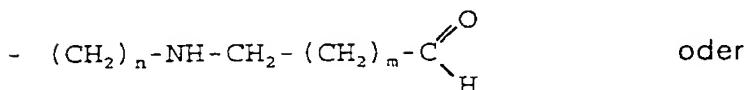
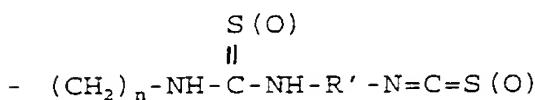
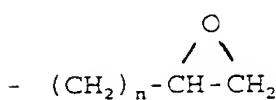
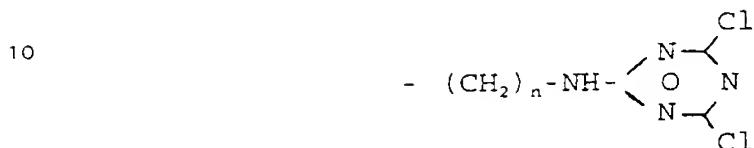
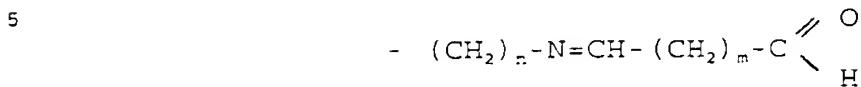
Z - R

(I)

- 22 -

worin Z Silicium, Siliciumdioxid, ein Silicatglas oder eine oxidierte Siliciumschicht bedeutet,

R - $(\text{CH}_2)_n\text{-Cl}$



bedeutet,

R' einen Alkylen- oder Arylenrest, insbesondere einen 1,4 Phenylenrest bedeutet, und

n und m jeweils eine positive ganze Zahl vorzugsweise von 1 bis 20 bedeuten.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 40 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren und
 Nukleinsäureanaloga.

- 23 -

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
 daß aminomodifizierte Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga mit
 einer Struktur der allgemeinen Formel (II) verwendet werden:

5



worin

R¹ Wasserstoff oder eine C₁-C₆-Alkylgruppe bedeutet,
 10 NS eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA oder ein
 Oligonukleotid, oder ein Nukleinsäureanalogon bedeutet,
 X eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe bedeutet und
 X mit dem 5'- oder/und 3'-terminalen Baustein von NS
 verknüpft ist.

15

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
 daß NS eine Nukleinsäure ist und R¹NH-X über das 5'-C-Atom des 5'-
 terminalen Zuckerrests, insbesondere eines Deoxyriboserests, mit NS
 20 verknüpft ist.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

25 daß X -(CH₂)_{n1}- oder (CH₂)_{n1}-O-P-

$$\begin{array}{c} O \\ || \\ (CH_2)_{n1} \\ | \\ OM \end{array}$$

bedeutet, worin

n1 eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20,
 z.B. 3,6 oder 12 bedeutet und
 30 M Wasserstoff oder ein Kation bedeutet.

- 24 -

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß aminomodifizierte Nukleinsäuren durch enzymatische Synthese und anschließende ortsspezifische Spaltung an der Aminogruppe erzeugt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase nach Immobilisierung des Biopolymers eine
Struktur der allgemeinen Formel (III) umfaßt:



worin Z eine Festphase bedeutet,

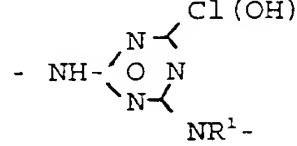
15 $R^2 - (CH_2)_{n2} -$ bedeutet,

$$Y - N=CH - (CH_2)_m - CH=N -$$

$$- \text{NH-CH}_2 - (\text{CH}_2)_m - \text{CH}_2 - \text{N} -$$

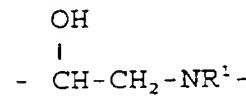
$$= \mathbf{N} \mathbf{E}^{\frac{1}{2}} =$$

- NR - ,



$$\begin{array}{c}
 \text{S(O)} & & \text{S(O)} \\
 || & & || \\
 -\text{NH}-\text{C}-\text{NH}- & \text{R}' & -\text{NH}-\text{C}-\text{NR}'- \\
 \end{array}$$

30 oder



bedeutet, R' , R^1 , NS und X wie in Anspruch 6 definiert sind,

n2 eine positive ganze Zahl oder 0, insbesondere von 1 bis 20, z.B. 1, 3, 6 oder 12 bedeutet „und“

m wie in Anspruch 4 definiert ist

- 25 -

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Biopolymere in einer Array-Struktur auf die Festphase
aufgebracht werden.

5

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Aufbringen der Biopolymere durch Mikroinjektionspipetten
erfolgt.

10

13. Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur
der allgemeinen Formel (III) wie in Anspruch 10 definiert.

14. Festphase nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Array-Struktur mit mehreren unterschiedlichen
Biopolymeren auf jeweils separaten Flächenbereichen enthält.

15. Festphase nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die einzelnen Flächenbereiche einen Durchmesser von etwa 0,5
bis 10 μm aufweisen.

20
25
16. Verwendung einer Festphase hergestellt nach einem der Ansprüche
1 bis 12 oder einer Festphase nach einem der Ansprüche 13 bis 15
zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den
immobilisierten Biopolymeren und freien Biopolymeren.

30
17. Verwendung nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,

daß die freien Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, peptidischen Nukleinsäuren (PNA), Peptiden, Polypeptiden, Lipiden und Kohlenhydraten.

5 18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die immobilisierten Biopolymere ausgewählt werden aus
Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga und PNA und eine auf eine
Hybridisierung basierende Wechselwirkung mit freien Biopolymeren
10 untersucht wird.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18 zur Sequenzierung
von Nukleinsäuren.

15 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18 für
Untersuchungen der Expression von Genen, der Funktion von Genen
und des Metabolismus.

21. Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen von auf einer
20 Hybridisierung basierenden Wechselwirkungen von immobilisierten
und freien Biopolymeren, umfassend eine Festphase hergestellt nach
einem der Ansprüche 1 bis 12 oder eine Festphase nach einem der
Ansprüche 14 bis 16, mindestens eine markierte
Hybridisierungssonde, einen Hybridisierungspuffer und eine
25 Hybridisierungskammer gegebenenfalls verbunden mit einer
Pumpvorrichtung und einer Temperaturkontrollvorrichtung.

22. Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 21 in einem Verfahren
zum Nachweis der Bindung von Hybridisierungssonden an
30 immobilisierte Biopolymere.

- 27 -

23. Verwendung nach Anspruch 22 umfassend das Ablösen gebundener Hybridisierungssonden von der Festphase und den Einsatz der Vorrichtung für weitere Hybridisierungszyklen.
- 5 24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß Hybridisierungssonden verwendet werden, die 5'-
aminomodifizierte Nukleotidbausteine enthalten.
- 10 25. Verwendung nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß gebundene Hybridisierungssonden einer ortsspezifischen Spaltung an der P-N-Bindung der 5'-aminomodifizierten Nukleotidbausteine unterzogen und dann von den auf der Festphase immobilisierten Biopolymeren abgelöst werden.
- 15 26. Verfahren zur gleichzeitigen Amplifikation und Markierung von cDNA-Molekülen umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen von RNA-Molekülen,
 - 20 (b) Reverses Transkribieren der RNA-Moleküle ohne Einführung von Markierungsgruppen in die resultierenden cDNA-Moleküle,
 - (c) gleichzeitiges Markieren und Amplifizieren der cDNA-Moleküle unter Verwendung von mit markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten und
 - 25 (d) gegebenenfalls Aufreinigen der resultierenden markierten cDNA-Moleküle.
27. Verfahren nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die in Schritt (a) bereitgestellten RNA-Moleküle eine Population unterschiedlicher RNA-Moleküle, z.B. Gesamt-RNA, mRNA oder andere RNA-Fraktionen aus einer biologischen Probe enthalten.

- 28 -

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,

daß in Schritt (c) mit Fluoreszenzgruppen, die vorzugsweise ausgewählt werden aus Fluorescein, CY3 und CY5, markierte
5 Deoxyribonukleosidtriphosphate verwendet werden.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28,

dadurch gekennzeichnet,

daß während des Amplifizierens 5'-aminomodifizierte
10 Nukleotidbausteine in die cDNA-Moleküle eingebaut werden.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29,

dadurch gekennzeichnet,

daß in Schritt (c) mindestens einer der für die Amplifikation
15 verwendeten Primer ein 5'-aminomodifizierter Primer ist.

31. Verfahren zu Immobilisierung von Biopolymeren an eine Festphase
umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Festphase ausgewählt aus metallischen
20 Festphasen, oxidischen Festphasen und metallisch-oxidischen
Festphasen, die mindestens auf einem Teil ihrer Oberfläche
Aminogruppen enthält,

(b) Bereitstellen eines Biopolymers und

(c) Immobilisieren des Biopolymers an die Festphase, wobei die
25 Aminogruppen enthaltende Festphase stabile kovalente oder
nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Biopolymer
ausbildet.

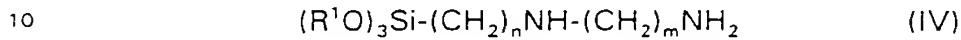
32. Verfahren nach Anspruch 31,

30 dadurch gekennzeichnet,

- 29 -

daß die Aminogruppen der Festphase durch Behandlung der Festphasenoberfläche mit einer Aminosilylverbindung erzeugt werden.

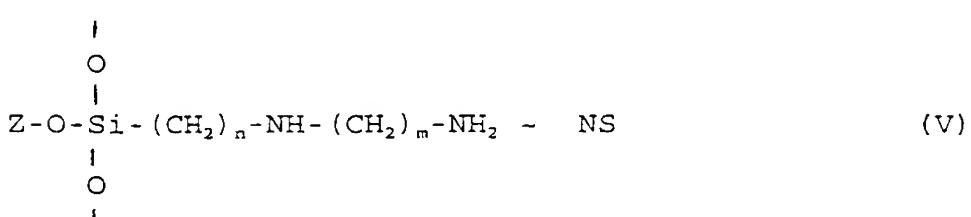
5 33. Verfahren nach Anspruch 32,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Aminosilylverbindung eine Struktur der allgemeinen Formel
 IV aufweist:



wobei R^1 Wasserstoff oder eine C₁-C₃-Alkylgruppe, vorzugsweise einen Methylrest, bedeutet und n und m wie in Anspruch 4 definiert sind.

15 34. Verfahren nach Anspruch 33,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man als Verbindung der Formel IV N-(6-Aminohexyl)-
 aminopropyltrimethoxysilan verwendet.

20 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Festphase nach Immobilisierung des Biopolymers eine
 Struktur der allgemeinen Formel (V) umfaßt:



30 wobei NS, Z, n und m wie in Anspruch 10 definiert sind und \sim eine
 kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung darstellt.

- 30 -

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Biopolymere in einer Array-Struktur auf die Festphase
aufgebracht werden.

5

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Aufbringen der Biopolymere durch Mikroinjektionspipetten
erfolgt.

10

38. Festphase mit immobilisierten Biopolymeren umfassend eine Struktur
der allgemeinen Formel (V) wie in Anspruch 35 definiert.

15

39. Festphase nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Array-Struktur mit mehreren unterschiedlichen
Biopolymeren auf jeweils separaten Flächenbereichen enthält.

20

40. Festphase nach Anspruch 38 oder 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß die einzelnen Flächenbereiche einen Durchmesser von etwa 0,5
bis 10 μm aufweisen.

25

41. Verfahren zur Auftrennung von doppelsträngigen Nukleinsäuren
aufgrund ihrer Basensequenz,
dadurch gekennzeichnet,
daß einer der die doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente bildenden
Nukleinsäurestränge mindestens einen 5'-aminomodifizierten
Nukleotidbaustein enthält.

30

42. Verfahren nach Anspruch 41,
dadurch gekennzeichnet,

- 31 -

daß die Auftrennung ein partielles Aufschmelzen der Nukleinsäuredoppelstränge durch einen Temperaturgradienten umfaßt.

5 43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42 zur Mutationsanalyse.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP00/08193
Weickmann & Weickmann

E 15. APR 2002

Frist:
Patentanwälte

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.
Copernikusstrasse 9
81679 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 02 April 2002 (02.04.02)	
Applicant's or agent's file reference 20349P WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP00/08193	International filing date (day/month/year) 22 August 2000 (22.08.00)
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

CA,CN,JP,KP,KR,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,EP,AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Pascal Piriou Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 20349P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08193	International filing date (day/month/year) 22 August 2000 (22.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 March 2001 (01.03.01)	Date of completion of this report 26 November 2001 (26.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08193

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-20 _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ 1-43 _____, as originally filed
 pages _____ _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____ _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____ _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08193

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

See supplemental box

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08193**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

Claims 26 - 30 relate to a method for the simultaneous amplification and labelling of cDNA molecules, and Claims 41 - 43 to a method for unravelling double-strand nucleic acids. The subjects of these claims are not so linked with the subjects of the remaining claims as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08193

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	12, 14, 15, 26 - 30, 37, 39	YES
		- 43	
	Claims	1 - 11, 13, 16 - 25, 31 - 36, 38	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 43	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 43	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents cited in the international search report represent the closest prior art:

- (A) US-A-5 760 130
- (B) US-A-5 622 826
- (C) WO-A-97/18226.

Independent Claims 1 and 31 relate to methods for immobilizing biopolymers on a solid phase. In one case (Claim 1), the surface of the solid phase comprises a reactive group to which a biopolymer, preferably an amino-modified nucleic acid, is covalently bonded. In the other case (Claim 31), the surface of the solid phase comprises an amino group which interacts covalently or non-covalently with the biopolymer.

The subjects of these claims are anticipated in a manner prejudicial to novelty by the disclosures in documents A (see columns 1 and 2 and the claims), B (see the claims and tables) and C (see the claims and Figure 2c). The same applies to Claims 2 - 11, 13, 16 - 25, 32 - 36 and 38, which also fail to comply with the requirements of PCT Article 33(3).

.../...

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08193

(Continuation of V.2)

The subjects of Claims 12, 14, 15, 37, 39 and 40 do not appear to contain an inventive concept *per se* and therefore do not comply with the requirements of PCT Article 33(3).

The subjects of Claims 26 - 30 and 41 - 43, which are not dealt with in any of the international search report citations, are common general knowledge in the relevant technical field and therefore do not comply with the requirements of PCT Article 33(3).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08193**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Application No.	Publication date	Filing date	Priority date
Patent No.			(valid claim)
	(day/month/year)	(day/month/year)	(day/month/year)

DE-A-198 15 864 14.10.1999

08.04.1998

Should the claimed priority date not be valid, the above-mentioned document would become relevant for the assessment of novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 May 2001 (01.05.01)	
International application No. PCT/EP00/08193	Applicant's or agent's file reference 20349P WO
International filing date (day/month/year) 22 August 2000 (22.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
Applicant ANSORGE, Wilhelm et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 March 2001 (01.03.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer S. Mafia
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38